

M-2047-3
K. NARAHARA et al
09/325,214

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 6月 4日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第156169号

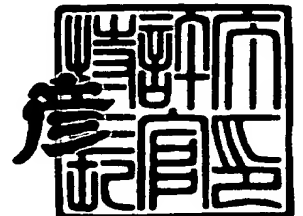
出 願 人
Applicant(s):

株式会社ミズホメディー

1999年10月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3075726

【書類名】 特許願

【整理番号】 MZM9803

【提出日】 平成10年 6月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 検出装置及び検出方法

【請求項の数】 2

【発明者】

 【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市藤木町 5 番地の 4 株式会社ミズホメディー内

 【氏名】 上原 敏幸

【特許出願人】

 【識別番号】 598034720

 【住所又は居所】 佐賀県鳥栖市藤木町 5 番地の 4

 【氏名又は名称】 株式会社ミズホメディー

【代理人】

 【識別番号】 100097179

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平野 一幸

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 058698

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 検出装置及び検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料液体が添加される展開層を備え、前記展開層のうち、試料液体が添加される位置から離れた検出区域に、免疫学的にエピトープを有するキャッチャーが固定され、

二特異性抗体と、免疫学的にエピトープを有しかつ検出可能に構成されるマーカールとを、前記展開層に可溶化状態で移動可能となるように乾燥状態で保持させ、

前記二特異性抗体は、試料液体中の検出物質と前記マーカールとに特異性を有する第 1 の二特異性抗体と、試料液体中の検出物質と前記キャッチャーとに特異性を有する第 2 の二特異性抗体とを含むことを特徴とする検出装置。

【請求項 2】 請求項 1 記載の検出装置の展開層に、試料液体を添加し、前記二特異性抗体と前記マーカールとを可溶化させ、前記展開層中を移動させるとともに、前記第 1 の二特異性抗体と前記第 2 の二特異性抗体とを、検出物質を挟むように結合させ、前記第 1 の二特異性抗体を前記マーカールに結合させ、さらに、前記第 2 の二特異性抗体を前記キャッチャーに結合させることにより、前記検出区域において、試料液体中の検出物質の量に対応した検出結果を生成することを特徴とする検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料液体（尿や血液など）内における検出物質（生体成分）の存否を検出する検出装置及び検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

生体成分からなる検出物質の検出手法として、抗原又は抗体を用いた免疫学的検出方法がある。この方法は、高感度であり、特異性、簡便性に優れ、広く臨床検査領域で使用されている。そして、最近では、特殊な技術や訓練を経なくとも

、この方法による検査を簡便に達成できる技術が種々提案されている。

【0003】

このうち、特に操作性、判定性が優れ、短時間で結果を得られる免疫クロマトグラフィー法と呼ばれる一群の測定方法が提案され（特開平9-178748号公報）、既に一般大衆向けに商品化されている。

【0004】

この免疫クロマトグラフィー法は、予めニトロセルロース等の展開層に、着色ラテックス、金コロイド等を標識した試薬（着色標識体）と、展開層上の検出区域に固定化した無標識の試薬とを用い、試料液体中の検出物質の存在下で、免疫反応複合物を生成させ、この反応により、捕捉された着色標識体を目視確認するものである。この方法によれば、単に試料液体を添加位置に添加し、一定時間後に、検出区域における着色標識体の着色量を目視確認しさえすればよい。

【0005】

しかしながら、この方法では、検出物質と親和性のある、いわゆる抗原又は抗体に、標識物として、酵素、蛍光物質、発光物質、着色ラテックス、金コロイド等を、その目的に応じて、物理的又は化学的に結合させた標識抗原又は標識抗体を用意する必要がある。しかしながら、この標識化こそ重大な問題点を有しているのである。例えば、抗原や抗体などの蛋白質に、酵素を結合させるために、過ヨウ素酸酸化法（Enzyme Immunoassay, Igaku-Shoin, Tokyo, 1982）等の化学的処理を施した場合、抗原又は抗体、あるいは酵素の不可逆的失活が生じたり、活性の減少あるいは非特異的反応を引き起こす重合化が生じたりする。このような事情により、実際に使用できる標識体の収率は、非常に低いものにならざるを得ない。

【0006】

同様に、物理的（疎水結合等）な方法で、着色ラテックスに抗原あるいは抗体などの蛋白質を結合させる処理を行う場合も、着色ラテックスへの結合がランダムに起こり、抗原あるいは抗体の活性部位が潰れてしまい、十分な反応性を得るために、必要量以上の抗原又は抗体を使用する必要がある。また、吸着が100%進行しないため、無駄になる抗原又は抗体の量も馬鹿にならない。

【0007】

このような欠点を解決する手段として、二価性試薬を架橋剤として使用する方法 (Enzyme Immunoassay, Igaku-Shoin, Tokyo, 1982) が開発されたが、操作が煩雑で、これを行うには、高度の技術が必要である。さらに、反応自体が非常にセンシティブであるため、条件のわずかな変化が、標識体の性質に大きく影響し、標識体の調製法として、再現性が悪いといわれている。

【0008】

また、このような特異性の高い標識方法を用いたとしても、標識物あるいは抗原又は抗体等の活性を損なうことは免れないし、標識操作自体が化学反応であるため、100%標識化されることはない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者は、標識操作による抗体のロス、及び、活性低下を最小限にし、かつ、測定感度も従来技術と同等以上になる手法を鋭意研究し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、以上の事情に鑑み、標識操作によって、貴重な抗体を無駄にすることがなく、検出物質を、安価でしかも高感度に、免疫学的に検出する検出装置及び検出方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明の検出装置では、試料液体が添加される展開層を備え、展開層のうち、試料液体が添加される位置から離れた検出区域に、免疫学的にエピトープを有するキャッチャーが固定され、二特異性抗体と、免疫学的にエピトープを有しかつ検出可能に構成されるマーカーとを、展開層に可溶化状態で移動可能となるように乾燥状態で保持させ、二特異性抗体は、試料液体中の検出物質とマーカーとに特異性を有する第1の二特異性抗体と、試料液体中の検出物質とキャッチャーとに特異性を有する第2の二特異性抗体とを含む。

【0011】

この構成により、標識操作によって、貴重な抗体を無駄にすることがなく、検出物質を、安価でしかも高感度に、免疫学的に検出する検出装置を実現できる。

【0012】

【発明の実施の形態】

請求項1記載の検出装置では、試料液体が添加される展開層を備え、展開層のうち、試料液体が添加される位置から離れた検出区域に、免疫学的にエピトープを有するキャッチャーが固定され、二特異性抗体と、免疫学的にエピトープを有しかつ検出可能に構成されるマーカーとを、展開層に可溶化状態で移動可能となるように乾燥状態で保持させ、二特異性抗体は、試料液体中の検出物質とマーカーとに特異性を有する第1の二特異性抗体と、試料液体中の検出物質とキャッチャーとに特異性を有する第2の二特異性抗体とを含む。

【0013】

この構成により、標識抗体を使用せず、検出を行える。したがって、標識操作による抗体のロスがないし、特殊な器材を必要としないため、コストダウンしやすい。また、抗体の活性が低下するおそれもない。また、二特異性抗体を使用しているので、抗原抗体反応により、反応性や感度を向上できる。

【0014】

請求項2記載の検出方法では、上記検出装置の展開層に、試料液体を添加し、二特異性抗体とマーカーとを可溶化（微粒子が分散した状態を含む）させ、展開層中を移動させるとともに、第1の二特異性抗体と第2の二特異性抗体とを、検出物質を挟むように結合させ、第1の二特異性抗体をマーカーに結合させ、さらに、第2の二特異性抗体をキャッチャーに結合させることにより、検出区域において、試料液体中の検出物質の量に対応した検出結果を生成する。

【0015】

この構成により、試料液体を添加し、一定時間待ち、検出区域における検出結果を参照するだけで、検査が終了する。

【0016】

次に図面を参照しながら、本発明の実施の形態について説明する。図1は、本発明の一実施の形態における検出装置の原理模式図である。

【0017】

図1において、1は、乾燥状態で保管される展開層である。展開層1は、反応

支持体としての機能を有し、多孔質材または単孔質材で構成する。図1において、左端部が試料液体を添加する添加位置であり、添加位置に試料液体が添加されると、試料液体は、毛細管現象により、図1の左から右へ移動する。

【0018】

また、展開層1には、次の成分が乾燥状態で保持されている。まず、2は、添加位置の反対側の端部（検出区域）に固定されるキャッチャーである。キャッチャー2は、免疫学的にエピトープ（抗原決定基）を有し、後述するように、検出物質に二特異性抗体を介して結合するマーカーを、試料液体の流動に抗して、検出区域に止める役割を果たす。

【0019】

3は、添加位置と検出区域の中間に配置されるマーカーである。マーカー3は、免疫学的にエピトープを有し、かつ、電氣的、化学的、視覚的など何らかの手段により検出可能に構成される。ここで、マーカー3としては、不溶性着色粒子だけでなく、可溶化したものも使用できる。

【0020】

さらに、このマーカー3としては、それ自体でエピトープを有するマーカーの他に、本来エピトープを有しないマーカーと、エピトープを有する物質とを、化学的または物理的な修飾操作などで、一体化させたものであってもよい。なお、本例では、マーカー3として、目視可能な有色マーカーを用いている。

【0021】

4、5は、添加位置付近に保持される二特異性抗体である。このうち、第1の二特異性抗体4は、試料液体中の検出物質6とマーカー3とに特異性を有する。また、第2の二特異性抗体5は、試料液体中の検出物質6とキャッチャー2とに特異性を有する。

【0022】

ここで、二特異性抗体とは、2種類の異なるエピトープに対して、同時に結合できる能力を備えた抗体のことである。この場合の抗体とは、均一な蛋白質分子としての抗体のことであり、抗体の混合物であるポリクローナル抗体を指すのではない。

【0023】

さて、この二特異性抗体は、通常の動物種からは得られない人為的産物であり、この二特異性抗体を合成するには、次の3つの方法が採用されている。その第1は、細胞工学的的方法 (Behrsing, O. ら; J. Immunol. Methods, 156(1), 69-77, 1992、Takahashi, M. ら; Clin. Chem. 34(9), 1693-96, 1988、Suresh, M.R. ら; Methods Enzymol. 121(Immunochem. Tech. Pt. D. 210-28, 1986)) である。即ち、モノクローナル抗体 a を生産するハイブリドーマ A と、モノクローナル抗体 b を生産するハイブリドーマ B を融合させ、新しい融合細胞 (クアドローマ) を作成し、モノクローナル抗体 a とモノクローナル抗体 b のハイブリッド分子を生産する。

【0024】

第2は、蛋白質化学的方法 (Breibab, M. ら; Science, 229, 81-3, 1985、Parham, P.; Hum. Immunol., 12, 213-21, 1985、Glennie, M. J. ら; J. Immunol. 139(7), 2367-75, 1987) である。即ち、モノクローナル抗体 a とモノクローナル抗体 b のジスルフィド結合を還元して、半分子を作り、抗体 a と抗体 b 由来の半分子を再会合させ、両抗体 a、b のハイブリッド分子を作成する。

【0025】

第3は、遺伝子工学的的方法 (Songsivilai, S. ら; Biochem. Biophys. Res. Commun., 164(1), 271-6, 1989) である。即ち、モノクローナル抗体 a とモノクローナル抗体 b の抗原結合部位を1本のポリペプチド分子として発現するように作成した遺伝子を基に生産する。このうち、第1、第2の方法によれば、目的の二特異性抗体を比較的容易に生産できる。

【0026】

次に、図1から図4を参照しながら、本形態の検出装置による検出過程について、説明する。なお、図面において、各物質は、展開層1の表面上に描画されているが、これは、図面表現の便宜のためであって、実際には、各物質は、展開層1の内部に存在する。

【0027】

さてまず、図1の左端部にある、添加位置に試料液体を添加する。この添加に

より、乾燥固化した二特異性抗体 4、5 が溶解し、展開層 1 内を移動可能となる。

【0028】

ここで、図 2 に示すように、試料液体に検出物質 6 が存在する場合には、検出物質 6 を、第 1、第 2 の二特異性抗体 4、5 で挟む状態で、検出物質 6 が第 1、第 2 の二特異性抗体 4、5 に結合する。

【0029】

そして、試料液体が展開層 1 内を、毛細管現象により、右側へ移動するにつれ、図 3 に示すように、上述のように挟んだ状態になっている第 1 の二特異性抗体 4 も、展開層 1 内を右側へ移動し、第 1 の二特異性抗体 4 とマーカー 3 が抗原抗体反応を起こし、第 1 の二特異性抗体 4 とマーカー 3 が結合する。

【0030】

さらに、図 4 に示すように、この結合したものが、検出区域まで至ると、第 2 の二特異性抗体 5 がキャッチャー 2 に出会い、抗原抗体反応を起こして、第 2 の二特異性抗体 5 がキャッチャー 2 に結合する。

【0031】

その結果、第 2 の二特異性抗体 5 が、検出物質 6、第 1 の二特異性抗体 4 を介して結合する、マーカー 3 も、検出区域に固定され、試料液体が流動しても、検出区域に止まることになる。

【0032】

なお、検出物質 6 が存在しなければ、マーカー 3 と結合する第 1 の二特異性抗体 4 は、キャッチャー 2 に連結されることはなく、マーカー 3 は、検出区域よりも先（右側）へ移動し、検出区域にマーカー 3 が残存することはない。

【0033】

したがって、試料液体が滴下されて、図 4 の状態になるまでの、一定時間だけ待ち、検出区域を目視すれば、検出物質 6 の量に対応しただけのマーカー 3 が検出区域に存在することとなるため、容易に、検査結果を得ることができる。

【0034】

即ち、検出区域にマーカー 3 による着色を観察できれば陽性、できなければ陰

性と判定できる。

【0035】

【発明の効果】

本発明は、以上のように構成したので、検出物質との免疫複合体を形成した後に、標識化反応を生じさせることができる。また、標識抗体を用いずに検出を行えるので、貴重な抗体を無駄にしない。さらに、標識化による立体障害あるいは運動性の減弱化が起こらず、抗原抗体反応がスムーズに進行し、検出時間を短縮し、しかも、高感度化することができる。

さらに、免疫学的方法による標識化を採用しているので、マーカーについても、従来より使用されている酵素、金コロイド、着色ラテックス等の他に、水溶性染料等を用いることができ、従来、失活等の問題で標識化が難しかった物質も使用できるようになった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施の形態における検出装置の原理模式図

【図2】

本発明の一実施の形態における検出過程の説明図

【図3】

本発明の一実施の形態における検出過程の説明図

【図4】

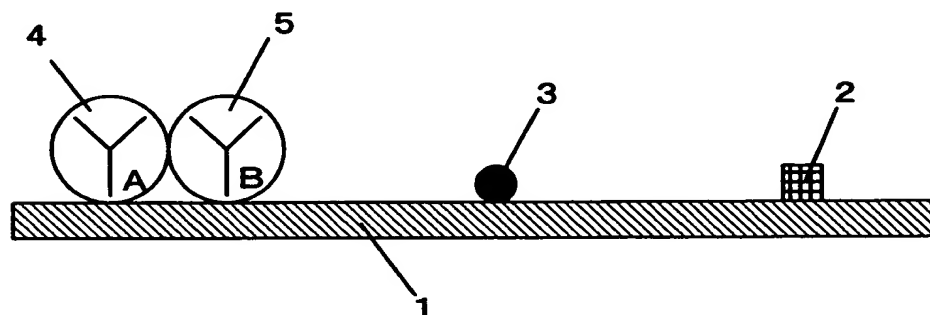
本発明の一実施の形態における検出過程の説明図

【符号の説明】

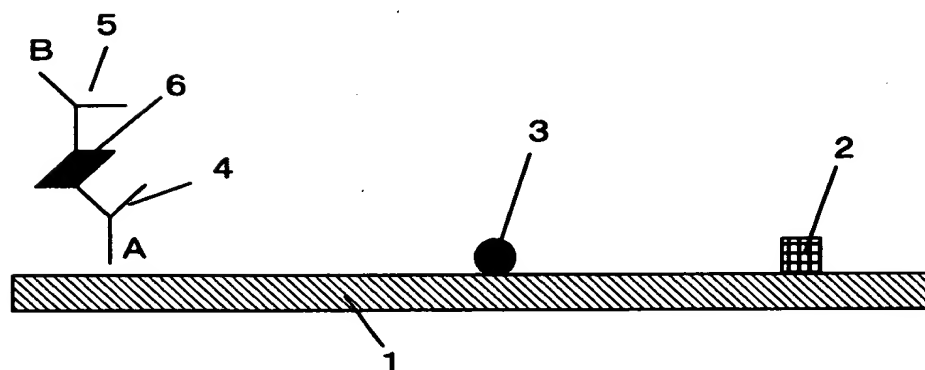
- 1 展開層
- 2 キャッチャー
- 3 マーカー
- 4 第1の二特異性抗体
- 5 第2の二特異性抗体
- 6 検出物質

【書類名】 図面

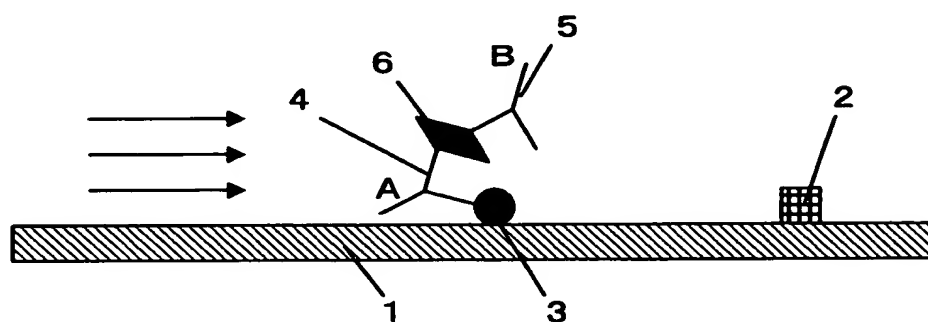
【図 1】



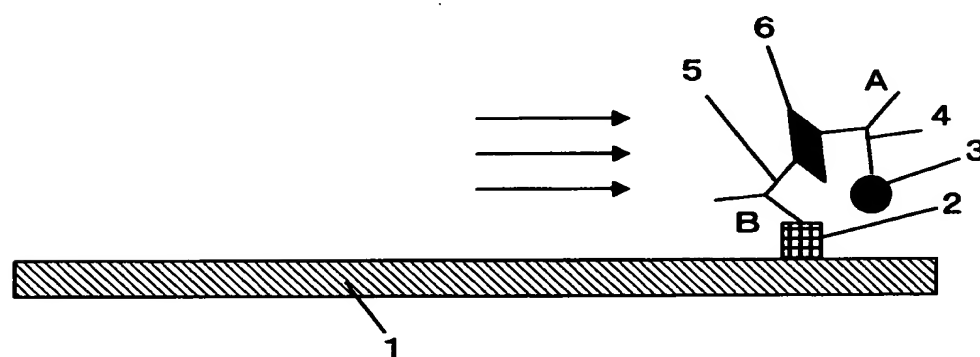
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標識操作によって、貴重な抗体を無駄にすることがなく、検出物質を、安価でしかも高感度に、免疫学的に検出する検出装置及び検出方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 試料液体が添加される展開層 1 のうち、試料液体が添加される位置から離れた検出区域に、免疫学的にエピトープを有するキャッチャー 2 を固定し、二特異性抗体と、免疫学的にエピトープを有しかつ検出可能に構成されるマーカー 3 とを、展開層に可溶化状態で移動可能となるように乾燥状態で保持させてなり、二特異性抗体は、試料液体中の検出物質とマーカーとに特異性を有する第 1 の二特異性抗体 4 と、試料液体中の検出物質とキャッチャーとに特異性を有する第 2 の二特異性抗体 5 とを含む。

【選択図】 図 1

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

598034720

【住所又は居所】

佐賀県鳥栖市藤木町5番地の4

【氏名又は名称】

株式会社ミズホメディー

【代理人】

申請人

【識別番号】

100097179

【住所又は居所】

福岡市中央区天神四丁目1番23号 ニューライフ

天神203号 平野特許事務所

【氏名又は名称】

平野 一幸

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598034720]

1. 変更年月日 1998年 2月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 佐賀県鳥栖市藤木町5番地の4
氏 名 株式会社ミズホメディー